

Agilent InfinityLab Pro iQ と Altura Oligo HPH-C18 カラムを用いたオリゴヌクレオチド分析

著者

Chae-Young, Ryu
Agilent Technologies, Inc.

概要

オリゴヌクレオチドの LC/MS 分析では、通常、適切なリテンションとピーク形状を得るために、アルキルアミン系のイオンペア試薬を使用する必要があります。ただし、これらの試薬では最適濃度の設定が難しく、しばしばトレードオフを伴います。濃度を高くするとクロマトグラフィー分離能は向上しますが、一方で質量分析ではシグナル抑制や汚染が顕著になります。

このアプリケーションノートでは、Agilent Altura Oligo HPH-C18 カラムを、Agilent InfinityLab Pro iQ 質量検出器および Agilent 1260 Infinity III Prime Bio LC システムと組み合わせて使用した、高性能なソリューションについて示します。ウルトライナートハードウェアテクノロジーを採用した Altura カラムは、オリゴヌクレオチドと金属表面との間の非特異的な二次的相互作用を最小限に抑えます。これにより、高感度 MS 検出に必要な低濃度のイオンペアリングを使用する場合でも、特に分析困難な n-1 mer 不純物に対して、優れたピーク分離能が得られます。

このシステムにおいて、InfinityLab Pro iQ の m/z 2 ~ 1,600 のスキャン範囲を活用することにより、ターゲットオリゴヌクレオチドの堅牢なデコンボリューションと正確な分子量確認を支援するのに十分なイオンセットを捕捉できることが確認できます。これらの結果は、ウルトライナートカラムケミストリーと高感度質量検出の相乗効果により、治療用オリゴヌクレオチドの包括的な不純物プロファイリングと特性解析のための信頼性の高いワークフローが実現されることを明確に示しています。

はじめに

医薬品業界では、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) や低分子干渉 RNA (siRNA) を含む、オリゴヌクレオチドベースの治療薬が急速に増加していることが確認されています。このような核酸治療薬は、医薬品開発においてパラダイムシフトをもたらしており、従来の低分子やモノクローナル抗体では「創薬不可能」と考えられていた遺伝子ターゲットを直接調節する機能を提供します。このため、希少な遺伝子疾患や慢性疾患の治療において、特に革新的な治療薬になっています¹。

オリゴヌクレオチドの製造および品質管理 (QC) において、純度は、医薬品の安全性と効能を確保するためのきわめて重要なパラメータです。従来は HPLC-UV が最適なメソッドでしたが、治療薬の構造が複雑化するにつれて、UV 検出のみに依存することの限界が露呈しています。特に、主成分とほぼ同一の物理化学的性質を持つ n-1 mer 不純物を同定および分離することは、きわめて困難です。その結果、包括的な純度分析、不純物プロファイリング、および分子量確認において、質量分析 (MS) が不可欠になっています²。

オリゴヌクレオチドは、負に帯電したリン酸骨格を持つために極性が高く、標準の逆相カラムではリテンションが低下します。このため、トリエチルアミン (TEA)、ジブチルアミン (DBA)、ヘキシルアミン (HA) などのイオンペア試薬を使用する必要があります³。これらのアルキルアミンを高濃度で使用すると、一般的にピーク分離能は向上しますが、多くの場合、LC/MS 分析において感度が大幅に低下したり、機器の汚染を引き起こしたりします。そのため、研究者は多くの場合、クロマトグラフィー分離能と MS 感度との間で、妥協点を見出さざるを得なくなります。

このアプリケーションノートでは、Altura Oligo HPH-C18 カラム、Pro iQ 質量検出器、および 1260 Infinity III Prime Bio LC システムを使用した、最適なオリゴヌクレオチド分析について示します。Agilent AdvanceBio Oligonucleotide カラムは、特に UV 最適化条件下での n-1 mer 種の分離において、その優れた分離能ですでに高く評価されています。Altura Oligo HPH-C18 カラムは、AdvanceBio シリーズと同じ高性能の充填剤を使用していますが、特長はウルトライナートカラムハードウェアを採用していることです。この技術により、ハードウェアの金属表面との二次的相互作用が最小限に抑えられるため、MS に対応するためにイオンペア試薬の濃度を低くした場合でも、分離能を向上させることができます。

オリゴヌクレオチドは通常、LC/MS において多価イオンを形成しており、主要な ASO イオンの分布は一般的に、 m/z 500 ~ 1,600 の範囲内で得られます。 m/z 2 ~ 1,600 の質量範囲を持つ Pro iQ は、Agilent OpenLab CDS のデコンボリューション機能と組み合わせることにより、主要な API と微量不純物の両方の分子量を正確に確認することができます。

本研究の結果は、Altura ウルトライナートカラムが、低イオンペアリング条件下でも高い分離能を実現すると同時に、Pro iQ が、オリゴヌクレオチドの電荷状態の分布を効果的にカバーするのに十分な感度と質量範囲を提供することを実証しています。さらに、このワークフローは、治療用オリゴヌクレオチドの包括的な特性解析のための堅牢で標準化されたソリューションを提供します。

実験方法

使用装置

この実験では、次の機器を使用しました。

- Agilent 1260 Infinity III Bio フレキシブルポンプ (製品番号 G7131C)
- Agilent 1290 Infinity III Bio マルチサンブラ (製品番号 G7137C)、サンプルサーモスタット付き
- Agilent 1290 Infinity III マルチカラムサーモスタット (製品番号 G7116B)、クイックコネクト Bio 熱交換器、標準フロー (製品番号 G7116-60071) 付き
- Agilent 1260 Infinity III ダイオードアレイ検出器 (製品番号 G7117C)、Max-Light カートリッジセル LSS、10 mm (製品番号 G7117-60020) 付き
- InfinityLab Pro iQ (G6160B)

標準と試薬

使用した標準は次のとおりです。

- オリゴヌクレオチドラダー標準試料：Agilent ssDNA (dT 15、20、25、30、35、40 nt) (部品番号 5190-9029)
- オリゴヌクレオチド分離能標準試料：Agilent ssRNA (部品番号 5190-9028)

試薬

ヘキシルアミンと 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールは Sigma-Aldrich から、酢酸は Fisher Scientific から、アセトニトリルは B&J から購入しました。

カラム

- AdvanceBio Oligonucleotide カラム、2.1 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 653750-702)
- Agilent Oligo HPH-C18 カラム、2.1 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 227215-702)

ソフトウェア

このアプリケーションノートでは、OpenLab CDS ソフトウェア、バージョン 2.8、機能パック 2 付きを使用しました。

メソッド

表 1. HAA 条件下での Agilent 1260 Infinity III Bio Prime LC の機器パラメータ

パラメータ	詳細
流量	0.6 mL/min
移動相	A) 100 mM HAA 水溶液 B) 100 mM HAA のアセトニトリル溶液
注入量	20 µL
サンブラ温度	4 °C
カラム温度	60 °C
UV 検出	260 nm
グラジエント	時間 (分) %A %B
	0 85 15
	0.5 85 15
	25 60 40
	26 0 100
	30 0 100
	30.1 85 15
	37 85 15
InfinityLab Pro iQ パラメータ	
イオン源	ESI (-)
イオン源パラメータ	ガス温度：325 °C ガス流量：11 L/min ネプライザ：45 psi キャピラリ電圧：4,500 V
データ取り込み	スキャン範囲：m/z 500 ~ 1,600 フラグメンタ：昇温 フラグメンタ (m/z) 電圧 (V) 75 100 250 120 450 130 750 140 1,000 160 1,300 170 1,800 180 スキャン時間：176 ms (5.59 Hz) 保管：プロファイル ダイバータバルブ： 0 分 - 廃液へ 1 分 - MS へ 25 分 - 廃液へ

表 2. HA-HFIP 条件下での Agilent 1260 Infinity III Prime Bio LC システムと Agilent InfinityLab Pro iQ の機器パラメータ

パラメータ	詳細
流量	0.6 mL/min
移動相	A) 15 mM HA + 25 mM HFIP B) アセトニトリル
注入量	20 µL
サンブラ温度	4 °C
カラム温度	60 °C
UV 検出	260 nm
グラジエント	時間 (分) %A %B
	0 85 15
	0.5 85 15
	25* 70 30
	26 10 90
	30 10 90
	30.1 85 15
	37 85 15

* オリゴヌクレオチドカラムについては、25 分時点での移動相組成を、溶媒 A と溶媒 B の比率 7:2:8 に維持しました。

結果と考察

図 1 に示すように、オリゴヌクレオチドドラダー標準試料（オリゴ dT、15～40 nt）およびオリゴヌクレオチド分離能標準試料（RNA、14、17、20、21 nt）を、メソッド 1 に従って分析しました。逆相（RP）モードでは、極性の高いオリゴヌクレオチドのリテンションを促進するために、通常、イオンペア試薬が使用されます。この場合、試薬濃度は、リテンションタイムと分離能の両方に直接影響を与えます。AdvanceBio Oligonucleotide カラムと Altura Oligo HPH-C18 カラムは、100 mM HAA 条件下では、39 および 40 nt 種の分離において同等の性能を示しました。これは、高濃度のイオンペア試薬が、ハードウェア固有の差異を効果的に相殺できることを示しています。

一方、MS での対応を確保するために、HA 濃度を 15 mM まで低くした場合、AdvanceBio Oligonucleotide カラムでは、39 および 40 nt のオリゴ dT 種間の分離能が大幅に低下することが観察されました（図 2）。ただし、20 および 21 nt の RNA 配列の分離は、今までどおり正常に実施することができたため、AdvanceBio Oligonucleotide カラムは、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の分析において、依然としてきわめて有効で効果的なソリューションです。

特に、Altura Oligo HPH-C18 カラムは、15 mM HA 条件下で優れた性能を示しており、39 および 40 nt 種間の分離能を、100 mM HAA メソッドの場合と同等のレベルに維持しました（図 3）。さらに、同等量のサンプルをロードした場合でも、Altura Oligo HPH-C18 カラムは、AdvanceBio Oligonucleotide カラムと比較して、大幅に高いピーク強度を示しました。これらの結果は、オリゴヌクレオチド分析におけるきわめて重要な要素、すなわち非特異的な二次的相互作用を低減する際に、カラムハードウェアが果たす役割を明確に示しています。特に MS に対応するためにイオンペア試薬の濃度を最小限に抑える場合、このような相互作用を本質的に防止するか、または効果的に抑制する特殊なハードウェア材料を使用することが、最適なピーク形状と回収率を確保するために最も重要であることは明らかです。

図 3 で同定されたオリゴヌクレオチドドラダー標準試料の 6 つの主要なピークは、InfinityLab Pro iQ の m/z 500～1,600 の範囲内において、明確な多価イオン分布を示しました。興味深いことに、これらの高電荷イオンの大部分は、 m/z 500～1,300 の間に集中していました。さらに、Pro iQ の性能により、4,500～12,000 Da の範囲のオリゴ dT 配列に対して、正確な MS スペクトルを取り込むことが可能になりました。その後の OpenLab CDS を用いたデコンボリューションにより、6 つのターゲットピークすべてに対して、分子量のシームレスで正確な検証を実施することができました。

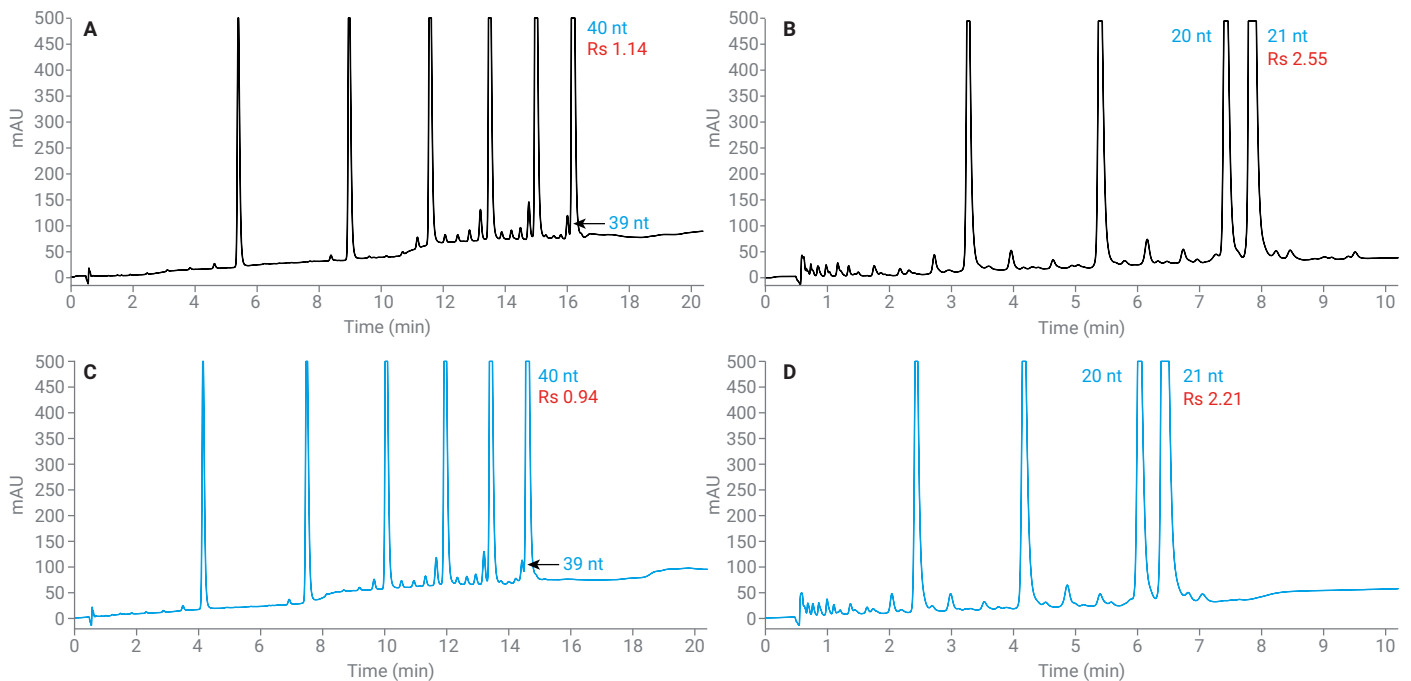


図 1. Agilent Altura Oligo HPH-C18 (A、B) カラムと Agilent AdvanceBio Oligonucleotide (C、D) カラムを用いて 100 mM HAA で分析した、オリゴヌクレオチドドラダー標準試料 (A、C) およびオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (B、D) の UV クロマトグラム

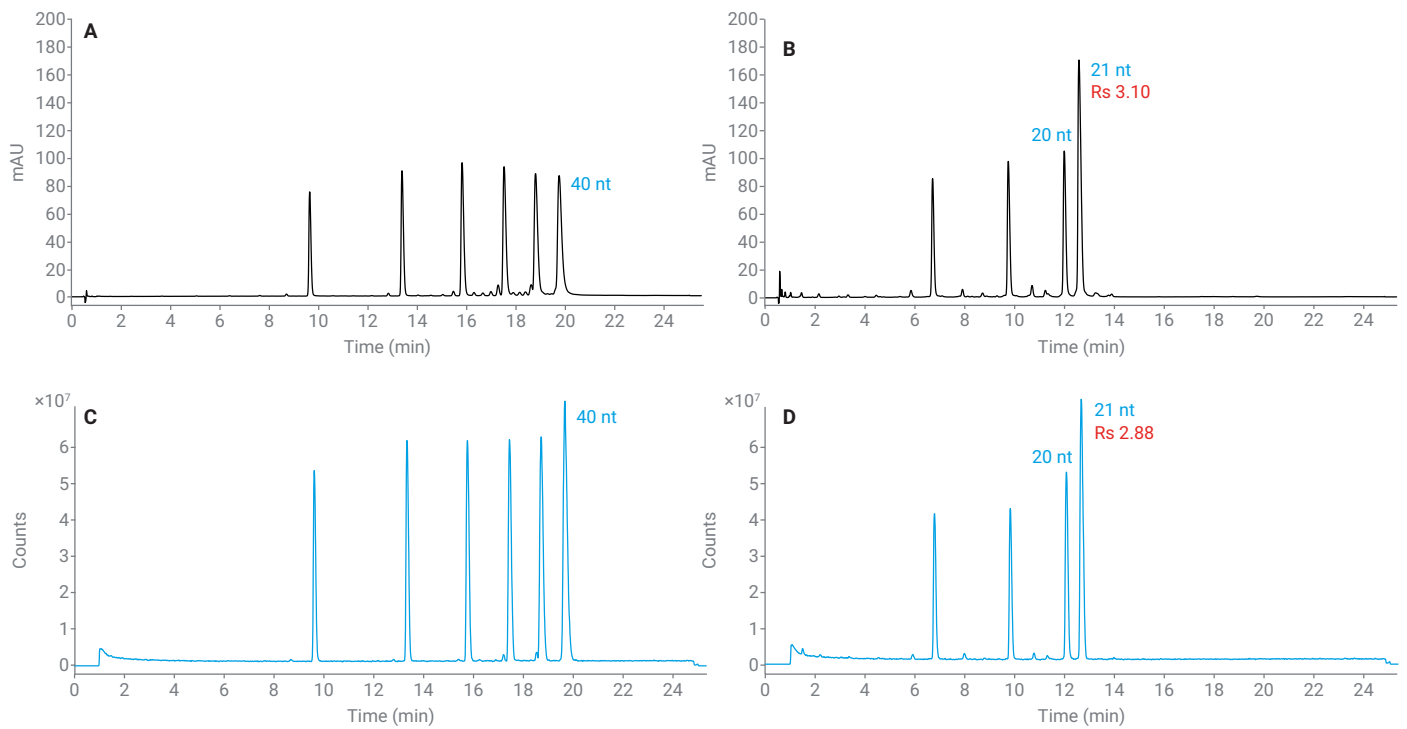


図 2. Agilent AdvanceBio Oligonucleotide カラムを用いて 15 mM HA/25 mM HFIP で分析した、オリゴヌクレオチドラダー標準試料 (A、C) およびオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (B、D) の UV クロマトグラムと Agilent InfinityLab Pro iQ トータルイオンクロマトグラム (TIC) (黒：UV クロマトグラム、青：TIC)

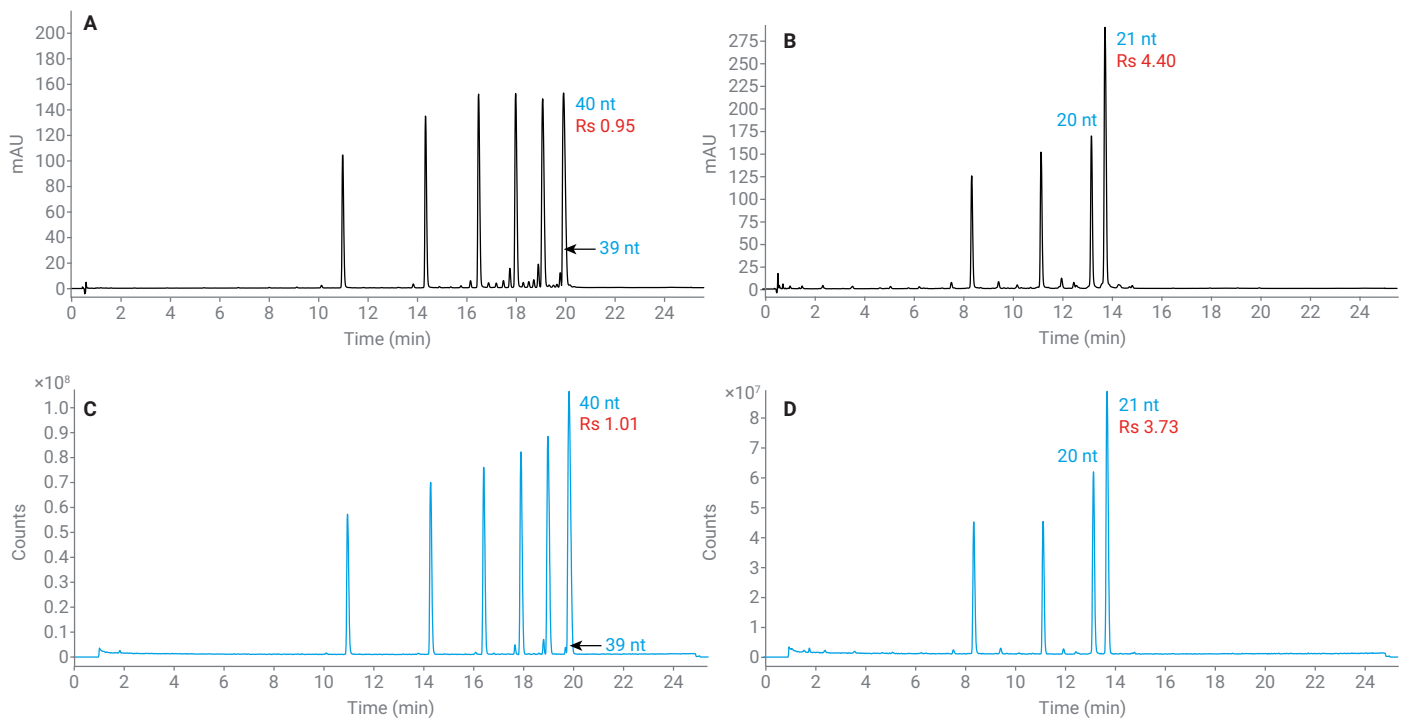


図 3. Agilent Altura Oligo HPH-C18 カラムを用いて 15 mM HA/25 mM HFIP で分析した、オリゴヌクレオチドラダー標準試料 (A、C) およびオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (B、D) の UV クロマトグラムと Agilent InfinityLab Pro iQ トータルイオンクロマトグラム (TIC) (黒：UV クロマトグラム、青：TIC)

39 nt オリゴヌクレオチド不純物は、40 nt のメインピークと溶出時間が非常に近い場合、特性解析を実施するのが本質的に困難であり、狭いクロマトグラフウィンドウを正確にサンプリングできる、十分に高いスキャンスピードを備えた MS システムが必要になります。図 5 に示すように、39 nt 種は、40 nt のピークから良好に分離されました。その後のデコン

ポリューションにより、40 nt 配列と比較して 304 Da 分の質量が減少していることが明らかになり、この切断された不純物の正確な同定が容易に実施できるようになりました。

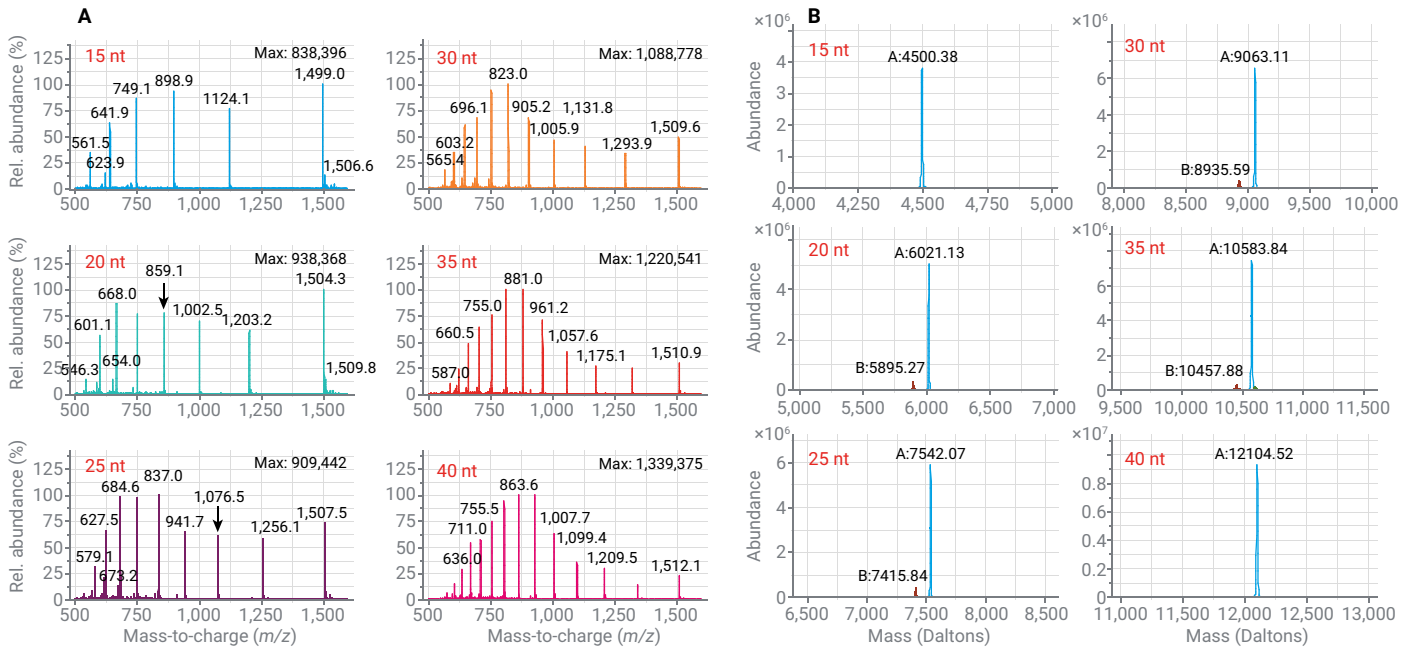


図 4. Agilent InfinityLab Pro iQ と Agilent OpenLab CDS を用いて取得した、15、20、25、30、35、および 40 nt の オリゴヌクレオチドラダーピークの MS 生スペクトル (A) とデコンボリュートしたスペクトル (B)

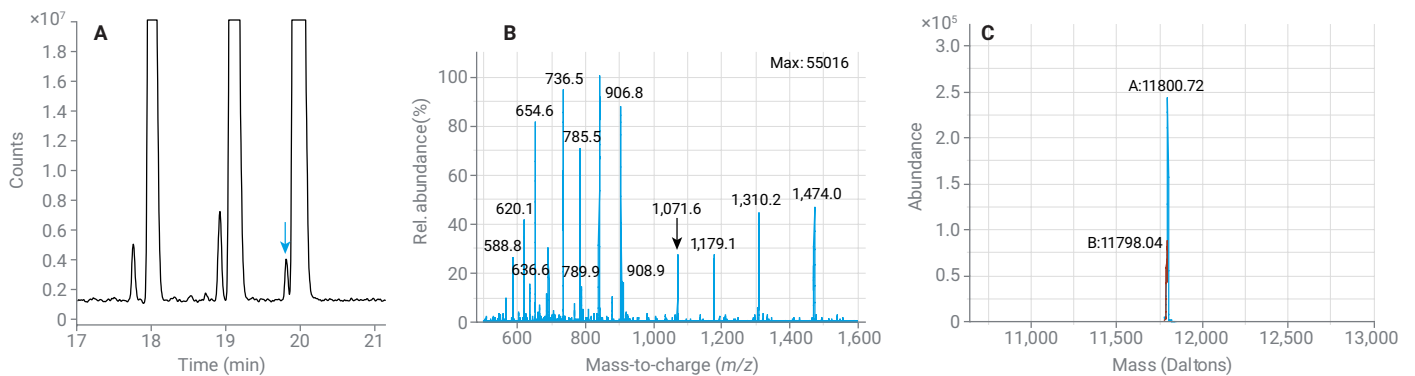


図 5. 図 3 で同定された 39 nt の オリゴヌクレオチドの MS 生スペクトルとデコンボリュートしたスペクトル。(A) 拡大した TIC、(B) MS 生スペクトル、(C) デコンボリュートしたスペクトル

結論

このアプリケーションでは、Agilent InfinityLab Pro iQ と Agilent OpenLab CDS デコンボリューションの能力を組み合わせることで、15 mM HA という低濃度イオンペアにおいても、オリゴヌクレオチド不純物の高分離能分離および分子量検証が実施できることを実証しました。

カラムハードウェアが原因のピークの広がりを低減するには、通常、高濃度のイオンペア試薬が必要になりますが、ウルトライナートコーティングテクノロジーを導入することにより、MS に適した条件下でクロマトグラフィー分離能が大幅に向上します。この技術進歩には、いくつかのきわめて重要な利点があります。すなわち、サンプル純度評価の精度の向上、試薬消費量の削減による運用コストの低減、化学的ノイズの最小化、および LC/MS メソッド開発の効率化を実現することができます。

さらに、InfinityLab Pro iQ の高速なスキャンスピードにより、向上したピーク分離能の完全性が維持されるため、39 nt のオリゴヌクレオチド不純物のような大きい種の正確な特性解析が可能になります。高分子量不純物は、従来の標準の LC/MS 条件下では分離および分析することが困難であったため、この機能は特に重要です。

参考文献

1. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*(10), 673–694.
2. Sutton, J. M.; Guimaraes, G. J.; Annavarapu, V; van Dongen, W. D.; Bartlett, M. G. Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*(9), 1775–1782.
3. Chae-Young, R.; Brian, L. Oligonucleotide Analysis with Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography and Agilent 1260 Infinity II Prime LC. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5323EN, **2022**.
4. Studzińska, S.; Rola, R.; Buszewski, B. The Impact of Ion-Pairing Reagents on the Selectivity and Sensitivity in the Analysis of Modified Oligonucleotides in Serum Samples by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2017**, *138*, 146–152.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-013414

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, March 24, 2026

5994-9057JAJP